

PCT

特許庁
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



BP

(51) 国際特許分類 A61K 38/22	A1	(11) 国際公開番号 WO98/40096 (43) 国際公開日 1998年9月17日(17.09.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00998 (22) 国際出願日 1998年3月11日(11.03.98) (30) 優先権データ 特願平9/74372 1997年3月11日(11.03.97) JP 特願平9/157645 1997年5月30日(30.05.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 雪印乳業株式会社 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.)(JP/JP) 〒065-0043 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号 Hokkaido, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 有沢広彦(ARISAWA, Hirohiko)(JP/JP) 〒329-0434 栃木県河内郡南河内町紙園2-19 ダイアパレス自治医大1番館313 Tochigi, (JP) 斉永博明(MASUNAGA, Hiroaki)(JP/JP) 〒321-0222 栃木県下都賀郡壬生町駅東町25-9 Tochigi, (JP) 小川浩美(OGAWA, Hiromi)(JP/JP) 〒320-0056 栃木県宇都宮市戸祭2-2-3 Tochigi, (JP)	東尾侃二(HIGASHIHO, Kanji)(JP/JP) 〒350-0822 埼玉県川越市山田1769-10 Saitama, (JP) (74) 代理人 弁理士 藤野清也(FUJINO, Seiya) 〒160-0004 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title: PREVENTIVES AND/OR REMEDIES FOR MULTIPLE ORGAN FAILURE (54) 発明の名称 多臓器不全予防及び/又は治療剤 (57) Abstract Preventives and/or remedies for multiple organ failure containing as the active ingredient tumor cytotoxic factor-II (TCF-II) or hepatocyte growth factor (HGF). These drugs are useful in preventing and/or treating deterioration in the general status due to burn, disseminated intravascular coagulation (DIC), circulatory failure, hemorrhagic shock, infectious diseases, acute pancreatitis, ischemic injury, hepatorenal syndrome, hemorrhage of digestive tract, nutritional metabolic failure, cancer at the terminal stage, acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), radiation injury, etc. and the progression from cachexy, etc. to multiple organ failure.		

(57) 要約

本発明は腫瘍細胞障害因子-II (Tumor Cytotoxic Factor-II; TCF-II) 又は肝細胞増殖因子 (HGF) を有効成分とする、多臓器不全予防及び／又は治療剤を提供する。本発明の剤は熱傷、播種性血管内凝固 (DIC)、循環不全、出血性ショック、感染症、急性膵炎、虚血性障害、肝腎症候群、消化管出血、栄養代謝不全、末期癌、後天性免疫不全症候群 (AIDS)、放射線障害などによる全身状態の悪化、及びカヘキシー (悪液質) などからの多臓器不全への進行の予防及び／又は治療に有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FR	フランス	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	GB	英国	LV	ラトヴィア	SD	スーダン
AT	オーストリア	DE	ドイツ	MC	モナコ	DG	ジブチ
AU	オーストラリア	EE	エストニア	MD	モルドバ	JM	ジャマイカ
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	MG	マダガスカル	MT	マルタ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GG	ガブーン	MK	マケドニア共和国	RU	ロシア
BB	バハマ	GM	ギニア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BC	ベネズエラ	HN	ホンデュラス	MN	モンゴル	US	米国
BD	バングラデシュ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UY	ウルグアイ
BE	ベルギー	IT	イタリア	MW	マラウイ	VN	ベトナム
BF	ブルキナファソ	JP	日本	MX	メキシコ	ZW	ジンバブエ
BG	ブルガリア	KE	ケニア	NE	ニジェール		
BR	ブラジル	KR	韓国	NL	オランダ		
BS	バハマ	LA	ラオス	NO	ノルウェー		
BT	ブータン	LB	レバノン	NZ	ニュージーランド		
BZ	ベリーズ	LC	セント・ルシア	PL	ポーランド		
CA	カナダ	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル		
CC	ココス (キリング) 諸島	LU	ルクセンブルグ	RO	ルーマニア		
CD	コンゴ民主共和国	LV	ラトヴィア	RS	セルビア		
CF	中央アフリカ共和国	LA	ラオス	SE	スウェーデン		
CG	コンゴ共和国	LB	レバノン	SG	シンガポール		
CH	スイス	LC	セント・ルシア	SI	スロベニア		
CI	コートジボワール	LI	リヒテンシュタイン	SK	スロバキア		
CK	クック諸島	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ		
CL	チリ	LV	ラトヴィア				
CM	カメルーン	LA	ラオス				
CN	中国	LB	レバノン				
CO	コロンビア	LC	セント・ルシア				
CR	コスタリカ	LI	リヒテンシュタイン				
CU	キューバ	LU	ルクセンブルグ				
CV	カボベルデ	LV	ラトヴィア				
CY	キプロス	LA	ラオス				
CZ	チェコ	LB	レバノン				
DE	ドイツ	LC	セント・ルシア				
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン				
DM	ドミニカ	LU	ルクセンブルグ				
DO	ドミニカ共和国	LV	ラトヴィア				
EC	エクアドル	LA	ラオス				
EE	エストニア	LB	レバノン				
EG	エジプト	LC	セント・ルシア				
EH	西サハラ	LI	リヒテンシュタイン				
ER	エリトリア	LU	ルクセンブルグ				
ES	スペイン	LV	ラトヴィア				
ET	エチオピア	LA	ラオス				
FI	フィンランド	LB	レバノン				
FJ	フィジー	LC	セント・ルシア				
FK	フォークランド諸島	LI	リヒテンシュタイン				
FM	ミクロネシア連邦	LU	ルクセンブルグ				
FO	フェロエ諸島	LV	ラトヴィア				
FR	フランス	LA	ラオス				
GA	ガボン	LB	レバノン				
GB	英国	LC	セント・ルシア				
GD	グアドループ	LI	リヒテンシュタイン				
GE	ジョージア	LU	ルクセンブルグ				
GF	フランス領ギアナ	LV	ラトヴィア				
GG	ガブーン	LA	ラオス				
GH	ガーナ	LB	レバノン				
GI	ジブラルタル	LC	セント・ルシア				
GL	グリーンランド	LI	リヒテンシュタイン				
GM	ギニア	LU	ルクセンブルグ				
GN	ギニアビサウ	LV	ラトヴィア				
GP	フランス領ポリネシア	LA	ラオス				
GQ	ギニアビサウ	LB	レバノン				
GR	ギリシャ	LC	セント・ルシア				
GS	サウスジョージア	LI	リヒテンシュタイン				
GT	グアテマラ	LU	ルクセンブルグ				
GU	グアム	LV	ラトヴィア				
GW	ギニアビサウ	LA	ラオス				
GX	フランス領ギアナ	LB	レバノン				
GY	ガイアナ	LC	セント・ルシア				
HA	ハイチ	LI	リヒテンシュタイン				
HC	フランス領海外集約地域	LU	ルクセンブルグ				
HD	フランス領海外集約地域	LV	ラトヴィア				
HE	フランス領海外集約地域	LA	ラオス				
HF	フランス領海外集約地域	LB	レバノン				
HG	フランス領海外集約地域	LC	セント・ルシア				
HH	フランス領海外集約地域	LI	リヒテンシュタイン				
HI	フランス領海外集約地域	LU	ルクセンブルグ				
HJ	フランス領海外集約地域	LV	ラトヴィア				
HK	香港	LA	ラオス				
HL	ヘルゼンシュタイン	LB	レバノン				
HM	ヘルゼンシュタイン	LC	セント・ルシア				
HN	ホンデュラス	LI	リヒテンシュタイン				
HO	フランス領海外集約地域	LU	ルクセンブルグ				
HP	フランス領海外集約地域	LV	ラトヴィア				
HQ	フランス領海外集約地域	LA	ラオス				
HR	クロアチア	LB	レバノン				
HS	フランス領海外集約地域	LC	セント・ルシア				
HT	ハイチ	LI	リヒテンシュタイン				
HU	ハンガリー	LU	ルクセンブルグ				
HV	フランス領海外集約地域	LV	ラトヴィア				
HW	フランス領海外集約地域	LA	ラオス				
HX	フランス領海外集約地域	LB	レバノン				
HY	フランス領海外集約地域	LC	セント・ルシア				
HZ	フランス領海外集約地域	LI	リヒテンシュタイン				

明 細 書

多臓器不全予防及び／又は治療剤

技術分野

本発明は、新規な多臓器不全予防及び／又は治療剤に関する。

本発明により、熱傷、播種性血管内凝固（DIC）、循環不全、出血性ショック、感染症、急性膀胱炎、虚血性障害、肝腎症候群、消化管出血、栄養代謝不全、末期癌、後天性免疫不全症候群（AIDS）、放射線障害などによる全身状態の悪化、及びカヘキシー（悪液質）などからの多臓器不全への進行を予防し、あるいは治療することができる。

背景技術

多臓器不全の発症あるいは増悪は、その要因からみると、

- (1) 同一因子による、並列に数個の臓器障害の誘発、
- (2) ある臓器の異常による、特定の臓器異常の誘発、
- (3) 医源性因子の関与、

の3様式に大きく分類される。重度外傷や大きな手術による過度の侵襲、感染症、ショックなどは直接あるいは各種のメディエーターを介して(1)の様式で多臓器不全の発症、増悪に関与する。外傷による臓器障害や原発性の肝不全などに併発してみられる多臓器不全には、臓器相関の機序が働いた(2)の様式の関与が大きい。(3)は集中治療で行われる医療行為や、ある臓器障害への対応策が他の臓器へ障害性に働く様式である。しかし、実際の症例においては、これら3つの様式が絡み合いつつ病態の進行あるいは悪化に関与しているのが実状である。一般に多臓器不全の治療成績はきわめて不良であり、広範囲にわたる対応策をとっても、救命率は20～30%と低いのが実状である。

発明の開示

上述の状況に鑑み、本発明者らは多臓器不全の予防及び／又は治療薬を求めて鋭意探索した結果、ヒト線維芽細胞由来の糖蛋白質である腫瘍細胞障害因子-II (Tumor Cytotoxic Factor-II; TCF-II) 又はヒト血液、特に劇症肝炎患者の血液由来の蛋白性物質である肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor; HGF) に熱傷、播種性血管内凝固 (DIC)、循環不全、出血性ショック、感染症、急性肺炎、虚血性障害、肝腎症候群、消化管出血、栄養代謝不全、末期癌、後天性免疫不全症候群 (AIDS)、放射線障害などによる全身状態の悪化、及びカヘキシー (悪液質) などを原因とする多臓器不全に対し、優れた予防及び／又は治療効果があることを見出した。従って本発明は、TCF-IIまたはHGFを有効成分とする多臓器不全予防及び／又は治療剤を提供することを課題とする。

本発明は、TCF-II又はHGFを有効成分とする多臓器不全予防及び／又は治療剤に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、実施例4のTCF-IIのエンドトキシン誘発多臓器不全に対する防御効果を示す。

第2図は、実施例5のHGFのエンドトキシン誘発多臓器不全に対する防御効果を示す。

第3図は、実施例7のTCF-IIのジメチルニトロサミン誘発多臓器不全に対する防御効果を示す。

第4図は、実施例8のTCF-IIの薬物中毒 (チオアセタミド) を原発とした多臓器不全に対する防御効果を示す。

第5図は、実施例8のTCF-IIの薬物中毒 (アセトアミノフェン) を原発とした多臓器不全に対する防御効果を示す。

第6図は、実施例9のTCF-IIの塩化第二水銀による腎不全を原発障害とする多臓器不全に対する防御効果を示す。

第7図は、実施例10のTCF-IIのトリプシン誘発多臓器不全に対する防御

効果を示す。

第8図は、実施例11のTCF-IIの熱傷誘発多臓器不全に対する防御効果を示す。

第9図は、実施例12のTCF-IIの熱傷誘発多臓器不全に対する防御効果を示す。

第10図は、実施例13のHGFの熱傷誘発多臓器不全に対する防御効果を示す。

第1図～第10図中○は、TCF-II又はHGF投与群を、●は溶媒投与群を表す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の多臓器不全予防及び／又は治療剤は、熱傷、播種性血管内凝固（DIC）、循環不全、出血性ショック、感染症、急性肺炎、虚血性障害、肝腎症候群、消化管出血、栄養代謝不全、末期癌、後天性免疫不全症候群（AIDS）、放射線障害などによる全身状態の悪化、及びカヘキシー（悪液質）などからの多臓器不全への進行の予防及び／又は治療に有用である。これらの多臓器不全は、熱傷、外科手術、化学物質（医薬を含む）の投与、放射線の照射、他の疾病との併発等によって生ずる。

本発明の有効成分であるTCF-IIは、本発明者らによって見出されたヒト線維芽細胞由来の公知の蛋白質であり、下記の特性を有する。

i) 分子量（SDS電気泳動法）

非還元下 : $78,000 \pm 2,000$ 又は $74,000 \pm 2,000$

還元下 : $52,000 \pm 2,000$ （共通バンドA）

$30,000 \pm 2,000$ （バンドB）

$26,000 \pm 2,000$ （バンドC）

ii) 等電点 : 7.4 ～ 8.6

上記TCF-IIは、ヒト線維芽細胞培養液を濃縮しイオン交換体に吸着させ、

その溶出液をアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製する方法 (WO 90/10651 号公報)、あるいは遺伝子工学的的手法 (WO 92/01053 号公報) によって得ることができる。

本発明の有効成分である T C F - II は、線維芽細胞由来のものを用いることが可能であり、又、WO 90/10651 号公報に記載された遺伝子配列に基づいて、微生物や他の細胞より遺伝子組換え操作により生産されたものでもよい。又、WO 92/01053 号公報に開示された遺伝子工学的的手法により得られたものを用いてもよい。この時、宿主細胞又は微生物の違いによる糖鎖の異なったものや、糖鎖の結合していないものであっても使用可能である。しかし、糖鎖は生体内の代謝速度に関係しているため、糖鎖の結合しているものを用いることが望ましい。これらの方法により得られた T C F - II は、通常の単離精製法によってさらに濃縮、精製することができる。例えば、有機溶媒による沈殿法、塩析、ゲル濾過、モノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマト、電気泳動法等が挙げられる。モノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトによる精製は、特開平5-97号公報に開示されているモノクローナル抗体を用いて精製することができる。得られた精製 T C F - II は、凍結乾燥或いは凍結保存することができる。

その他、T C F - II と同様の活性を有するものであれば、本発明と同様の薬剤として利用可能である。例えば、T C F - II 蛋白質に 5 個のアミノ酸が挿入された肝細胞増殖因子 (H G F ; 特開昭63-22526号)、あるいは精製 Scatter Factor (S F ; Gherardi and Stocker, Nature, 346, 228 (1990)) などが挙げられる。

本発明の有効成分の H G F は、肝細胞を増殖させる活性を有し、劇症肝炎患者の血液から単離された、下記の特性を有する公知の蛋白性物質である (特許第 2 564486号明細書)。

- i) 分子量(SDS-PAGE) ; 非還元下 ; 76,000~92,000
- ii) 前記活性は56℃、15分間の加熱では失活せず、80℃、10分間の加熱により失活する、
- iii) トリプシンあるいはキモトリプシン消化により前記活性が失活する、

iv) ヘパリンに強い親和性を有する。

このHGFは、血漿を56℃程度で約15分間加熱し、硫酸濃度約 1.1~1.2Mの沈澱区分を取得し、これをゲルろ過、DEAE等陰イオン交換体によるイオン交換クロマトグラフィーで精製して得ることができる。又、HGFcDNA (BBRC, 163, 967-973, 1989 又は特開平 3-72883号公報) を用いて遺伝子工学的手法によっても得ることができる。

本発明の多臓器不全予防及び／又は治療剤は、注射剤として静脈、筋肉内、及び皮下に投与することができる。これらの製剤は、公知の製剤学的製法に準じ製造され、必要に応じpH調整剤、緩衝剤、安定化剤等を添加することができる。本発明の製剤を患者に投与する場合、投与患者の症状の程度、健康状態、年齢、体重等の条件によって異なり、特に限定されないが、成人1日当たり精製TCF-IIとして 0.6mg~600mg、好ましくは 6mg~60mgを含有する製剤を1日1回若しくはそれ以上投与すれば良い。HGFにおいても、この程度の量を同様に投与すれば良い。

このように投与することにより、前記要因に基づく種々の多臓器不全を予防、あるいは症状を軽減し、さらに治療することができる。

実施例

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明する。しかし、これらは単に例示するのみであり、本発明はこれらにより限定されるものではない。

〔実施例1〕

TCF-IIの精製

WO 90/10651 号公報に開示された方法及び東尾らの方法 (Higashio, K. et al. B.B.R.C., vol. 170, pp397-404 (1990)) に準じて細胞を培養し、精製TCF-IIを得た。即ち、ヒト線維芽細胞 IMR-90 (ATCC CCL 186) 細胞を5%仔牛血清を含むDMEM培地 100mlをいれたローラーボトルに 3×10^6 個移植し、0.5~2回転/分の回転速度で回転させながら7日間培養を続けた。総細胞数が 1×10^7

個になったところでトリプシンにより細胞を剥離し細胞をボトル底面に集め、5～9メッシュのセラミック100g（東芝セラミック社）を殺菌して投入し、24時間静置して培養した。その後、上記培養液を500ml加え、培養を継続した。7～10日ごとに培地を全量回収し、新鮮培地を補給した。このようにして2ヵ月間生産を継続し、ローラーボトル一本当たり4Lの培養液を回収した。このようにして得た培養液当たりの比活性は32 μ g/mlであった。培養液750Lをメンブランフィルター（MW 6000カット；アミコン社）処理によりUF濃縮し、CMセファデックス C-50（ファルマシア社）、Con-A セファロース（ファルマシア社）、Mono Sカラム（ファルマシア社）、ヘパリンセファロース（ファルマシア社）による5段階のクロマト精製を行い、精製TCF-IIを得た。この精製TCF-IIは、前記した分子量、等電点を示した。

〔実施例2〕

遺伝子組換えTCF-IIの生産

WO 92/01053 号公報に開示された方法に従い、TCF-II遺伝子を組み込んだ細胞を培養し、精製TCF-IIを得た。即ち、形質転換ナマルワ(Namalwa)細胞を培養し、培養液20Lを得た。この培養液をCM-セファデックスC-50クロマト（ファルマシア社）、Con-A セファロース CL-6Bクロマト（ファルマシア社）、Mono Sカラム（ファルマシア社）を装着したHPLCの順に処理を行い、約11mgの遺伝子組換え型TCF-IIを得た。このTCF-IIも前記と同様の分子量、等電点を示した。

〔実施例3〕

遺伝子組換えHGFの生産

HGF cDNAの発現ベクターは、プラスミドpcDNA1のNheI部位にマウスジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）転写単位、2.4kb断片を挿入し、さらにMiyazawaらによりクローニングされたHGF cDNA（BBRC, 163, 967-973, 1989）2.3kbをサイトメガロウイルス（CMV）プロモーターの下流に挿入して構築した。構築したHGF cDNA発現ベクター10 μ g とpSV2 neo 1 μ g をリポフェチンによるリポソ

ーム介在トランスフェクション法によりナマルワ (Namalwa)細胞にコトランスフェクションした。形質転換した細胞をG418耐性により選別した後、続いてメトレキセート (MTX)により遺伝子増幅した。HGF高生産株を2Lローラーボトルを用い、5%ウシ血清を含むDMEM培地1Lで37°C、7日間培養した。約20本のローラーボトル培養(回転数約2回/分)を実施し、約21Lの培養液を得た。このようにして得られた培養液は、4mg/LのHGFを含んでいた。HGFを含む培養液20Lについて、東尾らの方法(Higashio et al., BBRC vol. 170, 397-404, 1990)を若干改変し、CMセファデックスC-50(ファルマシア社)、Mono Sカラム(ファルマシア社)、ヘパリン5-PW(東ソー社)のFPLCによる3段階のクロマト精製を行い、SDS-電気泳動的に均一な精製HGFを約60%の収率で得た。

[実施例4]

エンドトキシン誘発多臓器不全に対する防御効果

7週齢のICR系雄マウス(1群25匹)に、実施例2で得られたTCF-II(100 μ g/匹)を1日2回5日間(但し最終日のみ1回投与)静脈内投与した。又、対照として、溶媒(前記pH6.03のクエン酸緩衝液、以下同じ)のみを投与した群をおいた。最終投与6時間後に、致死量のエンドトキシン(LPS-E. coli; 20mg/kg、ディフコラボラトリーズ社)を静脈内投与した。生存率を第1図に示す。溶媒投与群では4日以後の生存率が12%(3/25匹)であったのに対し、TCF-II投与群では56%(14/25匹)が生存した(第1図)。この結果より、TCF-IIがエンドトキシンに誘発される多臓器不全に対し、優れた防御効果を有することが確認された。

[実施例5]

エンドトキシン誘発多臓器不全に対する防御効果

7週齢のICR系雄マウス(1群15匹)に実施例3で得られたHGF(100 μ g/匹)を1日2回5日間(但し最終日のみ1回投与)静脈内投与した。又、対照として、溶媒(クエン酸緩衝液 pH 6.03)のみを投与した群をおいた。最終投与6時間後に、致死量のエンドトキシン(LPS-E. coli; 20mg/kg、ディフコラボ

ラトリーズ社)を静脈内投与した。生存率の結果を第2図に示す。この結果、溶媒投与群では4日目以降の生存率が13%(2/15匹)であったのに対し、HGF 1 mg/kg 投与群の生存率は、33%(5/15匹)であった。この結果より、HGFがエンドトキシンにより誘発される多臓器不全に対し、優れた防御効果を有することが確認された。

〔実施例6〕

エンドトキシン誘発多臓器不全に対する防御効果

6週齢のWistar系雄ラットに、浸透圧ポンプ(モデル12001、Alzet社)を用いてエンドトキシン(LPS-E. coli; 10mg/kg/日、ディフコラトリーズ社)を持続注入し、多臓器不全を発症させた。発症後群分け(1群9匹)し、溶媒又はTCF-II 1mg/kgを1日1回7日間静脈内投与した。最終投与終了翌日のラットの臨床検査値を、第1表に示す。溶媒投与群では総蛋白、アルブミン、プラスミノゲン及び総コレステロールが低下しカヘキシー状態を示したが、TCF-II投与群では有意にこれらの値が改善した(第1表)。この結果より、TCF-IIがエンドトキシンにより誘発されるカヘキシーを原因とする多臓器不全に対し、優れた防御効果を有することが確認された。

第 1 表

検査項目	健常マウス	LPS投与マウス	
		溶媒投与群	TCF投与群
総蛋白(g/dl)	5.4 ± 0.1	4.5 ± 0.1	5.5 ± 0.1 **
アルブミン(g/dl)	2.5 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.4 ± 0.0 **
プラスミノゲン (%)	105.5 ± 7.1	74.4 ± 3.6	96.6 ± 2.7 **
総コレステロール (mg/dl)	73.2 ± 2.3	59.0 ± 3.6	88.6 ± 2.9 **

(** : 溶媒投与群に対する有意差 ($p < 0.01$) を表す。)

[実施例 7]

ジメチルニトロサミン誘発多臓器不全に対する防御効果

7 週齢の ICR 系雄マウス (1 群 25 匹) に、TCF-II (100 μ g/匹) を 1 日 2 回 5 日間 (但し最終日のみ 1 回投与) 静脈内投与した。又、対照として、溶媒のみを投与した群をおいた。最終投与 6 時間後に、致死量の 0.15% ジメチルニトロサミン (DMN) (溶媒 : 生理食塩水、0.1ml/10g 体重、東京化成工業社) を静脈内投与した。発症 24 時間後のマウスの臨床検査値の結果を第 2 表に、及び生存率の結果を第 3 図に示す。溶媒投与群は GOT 及び GPT の異常な上昇、及び血液凝固時間の延長がみられたが、TCF-II 投与群では有意にこれを抑制した (第 2 表)。又、溶媒投与群では 4 日以後は全例が死亡したのに対し、TCF-II 投与群では全例が生存した (第 3 図)。この結果より、TCF-II がジメチルニトロサミンに誘発される多臓器不全に対し、優れた防御効果を有することが確認された。

第 2 表

検査項目	健常マウス	DMN 投与マウス	
		溶媒投与群	TCF 投与群
GOT (U/L)	42 \pm 2	810 \pm 252	51 \pm 8 **
GPT (U/L)	28 \pm 3	1580 \pm 506	97 \pm 21 **
血液凝固時間 (秒)	17 \pm 0.0	22 \pm 2.2	17 \pm 0.1 **

(** : 溶媒投与群に対する有意差 ($p < 0.01$) を表す。)

[実施例 8]

薬物中毒を原発とした多臓器不全に対する防御効果

7週齢のICR系雄マウス(1群25匹)に、TCF-II(100 μ g/匹)を1日2回5日間(但し最終日のみ1回投与)静脈内投与した。又、対照として、溶媒のみを投与した群をおいた。最終投与6時間後に、致死量のチオアセタミド(600mg/kg、和光純薬工業社)、及びアセトアミノフェン(800mg/kg、シグマ社)を投与した。生存率の結果を、第4図及び第5図に示す。この結果、チオアセタミド試験において、溶媒投与群ではチオアセタミド処置4日以降の生存率は12%(3/25匹)であったのに対し、TCF-II投与群では92%(23/25匹)が生存した。又、アセトアミノフェン試験において、溶媒投与群ではアセトアミノフェン処置翌日に68%(17/25匹)が死亡したのに対し、TCF-II投与群では全例が生存した。この結果より、TCF-IIがチオアセタミド、及びアセトアミノフェンなどの薬物により誘発される多臓器不全に対し、優れた防御効果を有することが確認された。

〔実施例9〕

塩化第二水銀による腎不全を原発障害とする多臓器不全に対する防御効果

7週齢のICR系雄マウス(1群25匹)に、TCF-II(100 μ g/匹)を1日2回5日間(但し最終日のみ1回投与)静脈内投与した。又、対照として、溶媒のみを投与した群をおいた。最終投与6時間後に、致死量の塩化第二水銀(和光純薬工業社)を静脈内投与した。生存率の結果を、第6図に示す。溶媒投与群では4日以後の生存率は8%(2/25匹)であったのに対し、TCF-II投与群では全例が生存した(第6図)。この結果より、TCF-IIが塩化第二水銀による腎不全に誘発される多臓器不全に対し、優れた防御効果を有することが確認された。

〔実施例10〕

トリプシン誘発多臓器不全に対する防御効果

8週齢のWistar系雄ラットに、溶媒(1群55匹)又はTCF-II 1mg/kg(1群35匹)を1日2回5日間(計10回)静脈内投与し、最終投与翌日に致死量のトリプシン(シグマ社; 50000U/ml)とタウロコール酸(三光純薬社; 100mg/ml)との混合液0.16mlを総胆管より膀胱に向けて注入した。生存率の結果を、第7図に

示す。溶媒投与群では6日以後の生存率は、5% (3/55匹) であったのに対し、TCF-II投与群の生存率は29% (10/35匹) であった (第7図)。この結果より、TCF-IIがトリプシンに誘発される多臓器不全に対し、優れた防御効果を有することが確認された。

〔実施例11〕

熱傷誘発多臓器不全に対する防御効果

7週齢のWistar系雄ラット (1群50匹) に、溶媒又はTCF-II 1mg/kg を1日2回6日間 (但し最終日のみ1回投与) 静脈内投与した。最終投与6時間後、剃毛した背部に加熱プレート (岩城硝子社) で25%熱傷 (250℃、30秒) を作製した。生存率を第8図に示す。又、熱傷処置4時間後のラットの臨床検査値を第3表に示す。25%熱傷を受けたラット (熱傷処置4時間後) において、循環血漿量の減少 (Ht値上昇、総蛋白減少、アルブミン減少)、肝腎障害 (GPT上昇、BUN上昇) が見られ、熱傷ショックによる多臓器不全が起きていることが確認された (第3表)。又、溶媒投与群の6日以後の生存率は、12% (6/50匹) であったのに対し、TCF-II投与群の生存率は、40% (20/50匹) であった (第8図)。これらの結果より、TCF-IIが熱傷により誘発される多臓器不全に対し、優れた防御効果を有することが確認された。

第 3 表

検査項目	熱傷処置前	熱傷処置4時間後
ヘマトクリット値 (%)	44.8 ± 1.8	53.9 ± 3.6
総蛋白 (g/dl)	7.2 ± 0.5	5.8 ± 0.7
アルブミン (g/dl)	3.1 ± 0.2	2.4 ± 0.3
GPT (U/L)	20.5 ± 5.8	150.0 ± 30.4
尿素窒素 (mg/dl)	21.5 ± 1.9	43.5 ± 7.3

〔実施例 1 2〕

熱傷誘発多臓器不全に対する防御効果

9 週齢の Wistar 系雄ラットに、85℃の熱湯で40%熱傷を作製した。熱傷後、1 群27匹に群分けし、溶媒又はTCF-II 1mg/kg を1日3回3日間（計9回）静脈内投与した。生存率を第9図に示す。溶媒投与群の8日以後の生存率は37%（10/27匹）であったのに対し、TCF-II投与群の生存率は67%（18/27 匹）であった。これらの結果より、TCF-IIが熱傷により誘発される多臓器不全に対し、優れた防御効果を有することが確認された。

〔実施例 1 3〕

熱傷誘発多臓器不全に対する防御効果

9 週齢のWistar系雄ラットに、85℃の熱湯で40%熱傷を作製した。熱傷後、1 群10匹に群分けし、溶媒又はHGF 1mg/kg を1日3回3日間（計9回）静脈内投与した。生存率を第10図に示す。溶媒投与群の11日目以降の生存率は20%（2/10匹）であったのに対し、HGF 1mg/kg 投与群の生存率は40%（4/10匹）であった。この結果より、HGFが熱傷により誘発される多臓器不全に対し、優れた防御効果を有することが確認された。

〔実施例 1 4〕

TCF-II製剤の製造

実施例2により得られた遺伝子組換えTCF-IIの、注射剤の製造例を示す。

(1)	TCF-II	20 μ g
	ヒト血清アルブミン	100 mg

上記組成をpH6.03のクエン酸緩衝液（10mM クエン酸ナトリウム、0.3M食塩、0.03%ポリソルベートより構成される）に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2 mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

(2)	TCF-II	40 μ g
	ツイーン80	1 mg
	ヒト血清アルブミン	100 mg

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

(3)	TCF-II	20 μ g
	ツイーン80	2 mg
	ソルビトール	4 g

上記組成をpH6.03のクエン酸緩衝液に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

(4)	TCF-II	40 μ g
	ツイーン80	1 mg
	グリシン	2 g

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

(5)	TCF-II	40 μ g
	ツイーン80	1 mg
	ソルビトール	2 g
	グリシン	1 g

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

(6)	TCF-II	20 μ g
	ソルビトール	4 g
	ヒト血清アルブミン	50 mg

上記組成をpH6.03のクエン酸緩衝液に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

(7)	TCF-II	40 μ g
	グリシン	2 g
	ヒト血清アルブミン	50 mg

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶

に2 mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

- | | |
|----------------|------------|
| (8) T C F - II | 40 μ g |
| ヒト血清アルブミン | 50 mg |

上記組成をpH6.03のクエン酸緩衝液に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2 mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

[実施例15]

HGF製剤の製造

実施例3により得られた遺伝子組換えHGFの、注射剤の製造例を示す。

- | | |
|-----------|------------|
| (1) HGF | 40 μ g |
| ヒト血清アルブミン | 100 mg |

上記組成をpH6.08のクエン酸緩衝液に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2 mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

- | | |
|-----------|------------|
| (2) HGF | 20 μ g |
| ツイーン80 | 1mg |
| ヒト血清アルブミン | 100mg |

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2 mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

- | | |
|-----------|------------|
| (3) HGF | 30 μ g |
| ソルビトール | 4g |
| ヒト血清アルブミン | 50mg |

上記組成をpH7.0の0.01Mリン酸緩衝液に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に20mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

産業上の利用可能性

本発明によりTCF-IIあるいはHGFを有効成分とする多臓器不全予防及び／又は治療剤が提供される。本発明の多臓器不全予防及び／又は治療剤は、熱傷、播種性血管内凝固(DIC)、循環不全、出血性ショック、感染症、急性膵炎、

虚血性障害、肝腎症候群、消化管出血、栄養代謝不全、末期癌、後天性免疫不全症候群（A I D S）、放射線障害などによる全身状態の悪化、及びカヘキシー（悪液質）などからの多臓器不全への進行を予防及び／又は治療するのに有用である。

請 求 の 範 囲

1. 腫瘍細胞障害因子-II (Tumor Cytotoxic Factor-II; T C F -II) 又は肝細胞増殖因子(Hepatocyte Growth Factor; H G F) を有効成分とする、多臓器不全予防及び／又は治療剤。
2. 多臓器不全が化学物質の投与に基づく多臓器不全である、請求項1記載の剤。
3. 化学物質がエンドトキシンである、請求項2記載の剤。
4. 化学物質がジメチルニトロサミンである、請求項2記載の剤。
5. 化学物質がトリプシンである、請求項2記載の剤。
6. 多臓器不全が、薬物中毒を原発とした多臓器不全である、請求項1記載の剤。
7. 薬物がチオアセタミドまたはアセトアミノフェンである、請求項6記載の剤。
8. 多臓器不全が、塩化第二水銀による腎不全を原発障害とする多臓器不全である、請求項1記載の剤。
9. 多臓器不全が、熱傷に基づく多臓器不全である、請求項1記載の剤。

図 1

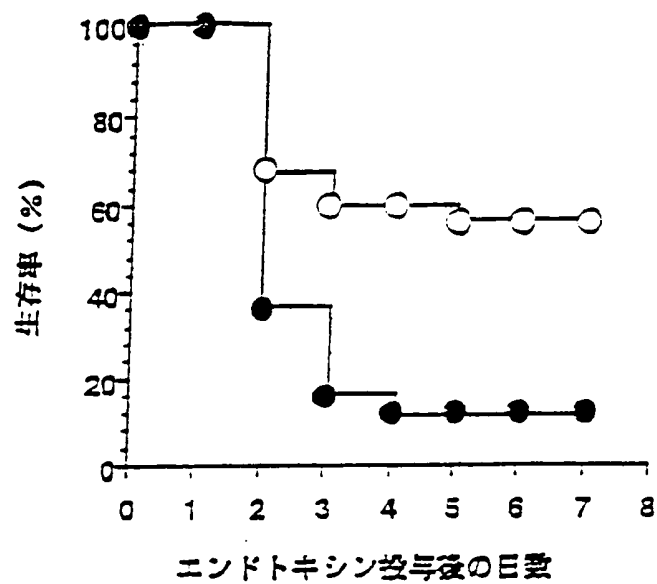


図 2

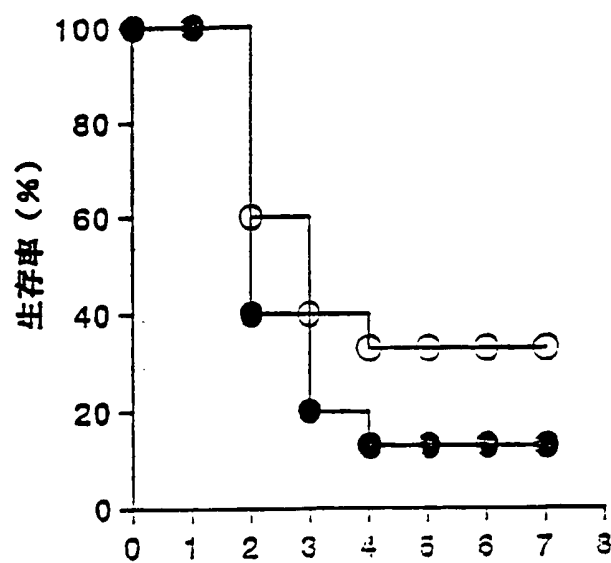


図 3

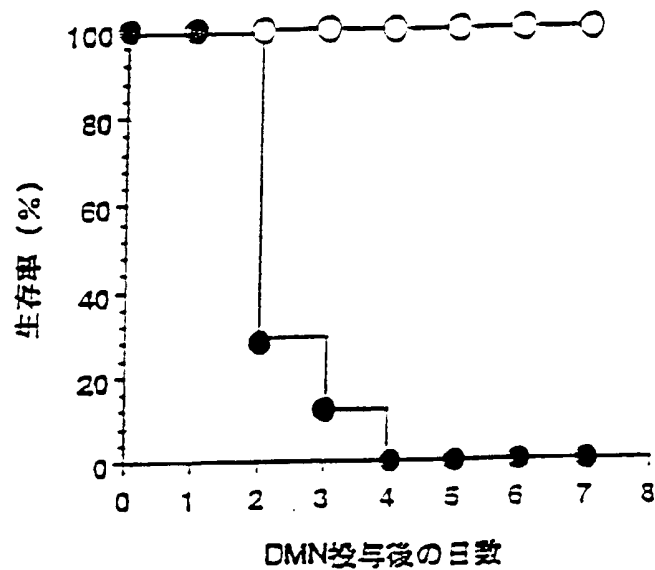


図 4

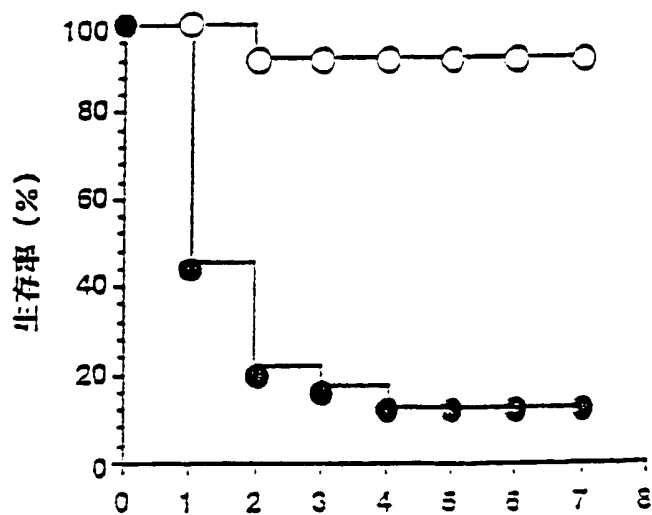


図 5

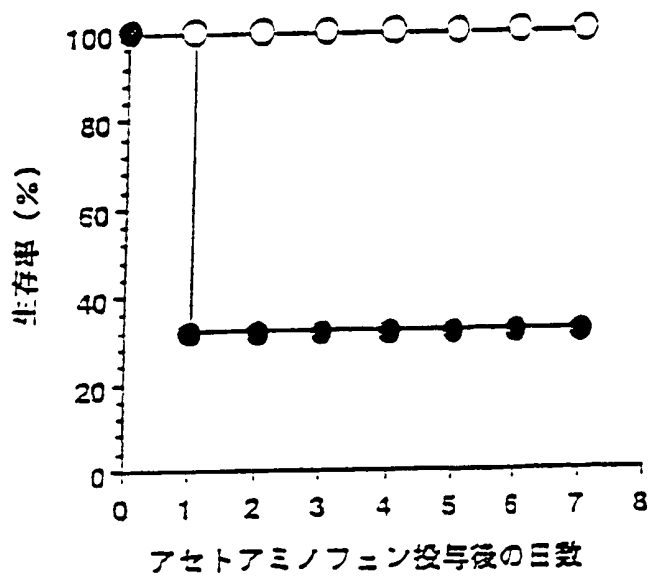


図 6

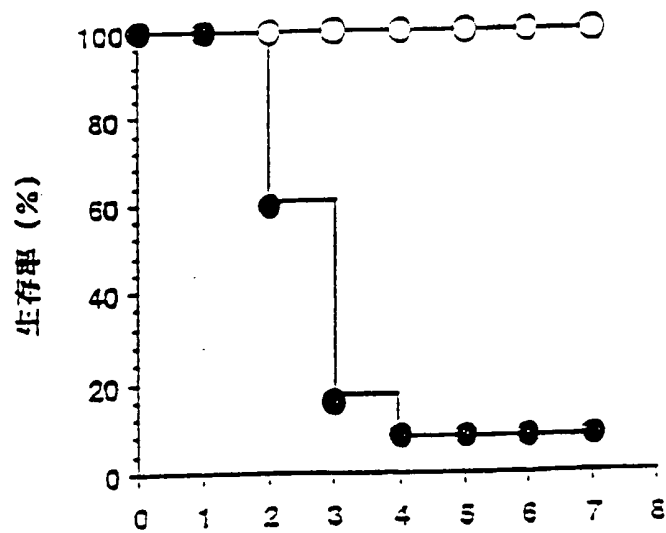


図 7

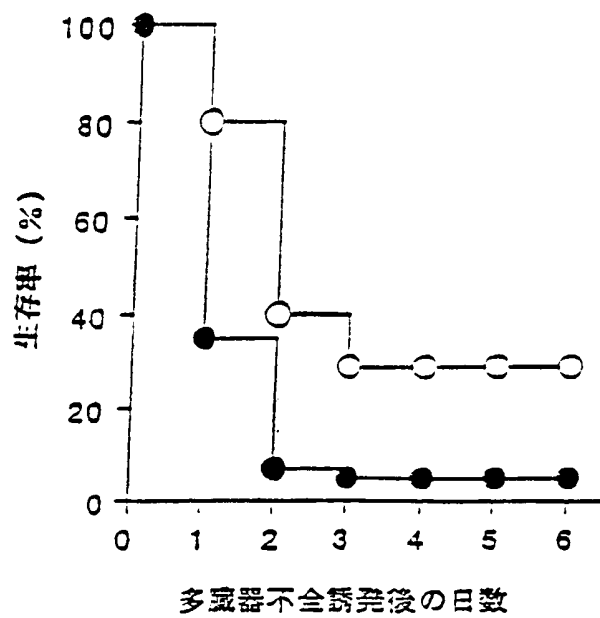


図 8

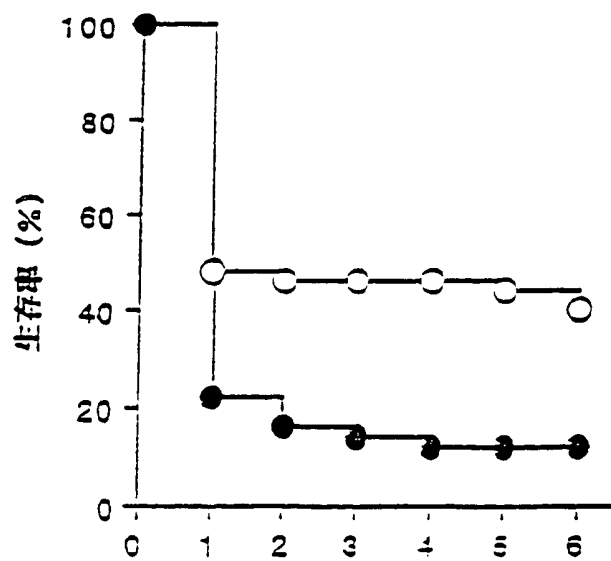


図 9

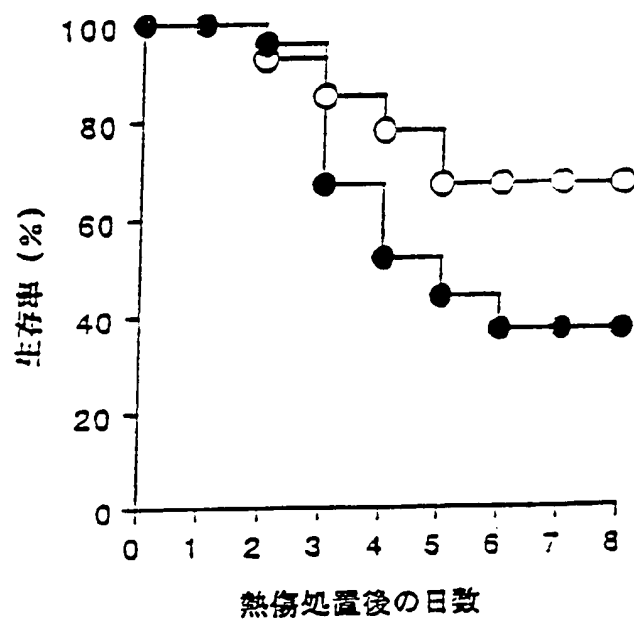
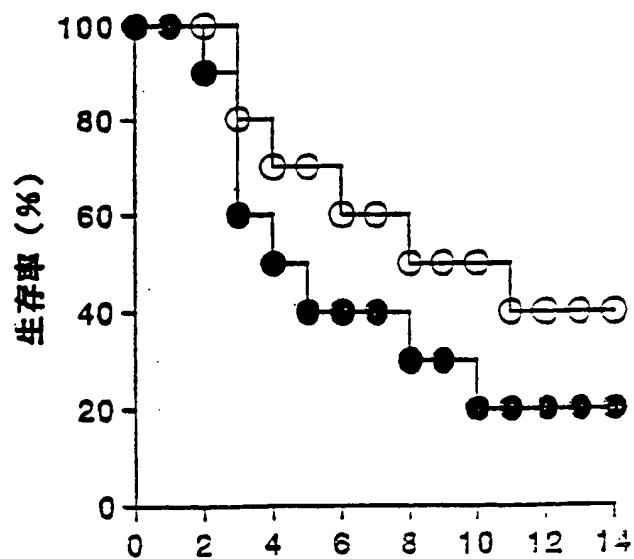


図 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00998

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ A61K38/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ A61K38/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), CAPLUS (STN), WPIDS (STN), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 6-40935, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), February 15, 1994 (15. 02. 94), Column 1, 2	1-3, 6, 9
A	& CA, 2100720, A & EP, 588477, A2	4, 5, 7, 8
A	Toyokatsu Takehara et al., "Structure of Hepatic Cell Growth Factor (HGF) and Physiological Effect (in Japanese)", Protein, Nucleic Acid and Enzyme, 1991, Vol. 36, No. 7 pp.265-274	4, 5, 7, 8 1-3, 6, 9
Y	JP, 4-49246, A (Toshikazu Nakamura), February 18, 1992 (18. 02. 92), Pages 1, 5 & EP, 462549, A	1-3, 6, 9
A		4, 5, 7, 8
Y	HUMES, H.D., et al., "Renal Tubule Cell Repair following Acute Renal Injury", Miner. Electrolyte Metab., 1995, Vol. 21, pp.353-365	1-3, 6, 9
A		4, 5, 7, 8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
May 18, 1998 (18. 05. 98)Date of mailing of the international search report
May 26, 1998 (26. 05. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00998

C. (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 6-40938, A (Toshikazu Nakamura and others), February 15, 1994 (15. 02. 94), Column 1 (Family: none)	1-3, 6, 9
A		4, 5, 7, 8
Y	JP, 6-247872, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), September 6, 1994 (06. 09. 94), Column 1 & CA, 2116192 & EP, 612530, A2 & US, 5510327, A	1-3, 6, 9
A		4, 5, 7, 8
Y	JP, 8-176007, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), July 9, 1996 (09. 07. 96), Column 1 & WO, 96/20004, A1 & EP, 754051, A1	1-3, 6, 9
A		4, 5, 7, 8
Y	JP, 6-25273, A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), February 1, 1994 (01. 02. 94), Column 2 & EP, 563908, A1 & CA, 2092971, A & US, 5432267, A	2, 3
A		1, 4-9
Y	JP, 6-56692, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), March 1, 1994 (01. 03. 94), Column 2 & CA, 2100720, A & EP, 588477, A2	9
A		1-8
A	Nobuyuki Shima et al., "Structure of Tumor Cell Damage Factor (F-TCF) and Various Bioactivity (in Japanese)"	1-9

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/00998

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁸ A 61 K 38/22

B. 調査を行った分野
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁸ A 61 K 38/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
MEDLINE (STN), CAPLUS (STN), WPIDS (STN), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	J P, 6-40935, A (雪印乳業株式会社), 15. 2月. 1994 (15. 02. 94), Column 1, 2 & CA, 2100720, A, & EP, 588477, A2	1-3, 6, 9 4, 5, 7, 8
A Y	竹原 豊浩ほか, '肝細胞増殖因子 (HGF) の構造と生理作用' 蛋白質 核酸 酵素, 1991, 36巻, 7号, pp. 265-274	4, 5, 7, 8 1-3, 6, 9
Y A	J P, 4-49246, A (中村 敏一), 18. 2月. 1992 (18. 02. 92), Page 1, 5 & EP, 462549, A	1-3, 6, 9 4, 5, 7, 8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 05. 98

国際調査報告の発送日

26.05.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田 村 豊 子 印

4 C 9736

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	HUMES, H.D., et. al.,	1-3,
A	'Renal Tubule Cell Repair following Acute Renal Injury',	6, 9
	Miner. Electrolyte Metab., 1995, vol.21, pp.353-365,	4, 5, 7, 8
Y	J P, 6-40938, A (中村 敏一ほか),	1-3,
A	15. 2月. 1994 (15. 02. 94), Column 1	6, 9
	(ファミリーなし)	4, 5, 7, 8
Y	J P, 6-247872, A (雪印乳業株式会社),	1-3,
	6. 9月. 1994 (06. 09. 94), Column 1	6, 9
A	& CA, 2116192,	4, 5, 7, 8
	& EP, 612530, A2,	
	& US, 5510327, A	
Y	J P, 8-176007, A (雪印乳業株式会社),	1-3,
	9. 7月. 1996 (09. 07. 96), Column 1	6, 9
A	& WO, 96/20004, A1,	4, 5, 7, 8
	& EP, 754051, A1	
Y	J P, 6-25273, A (第一製薬株式会社),	2, 3
A	1. 2月. 1994 (01. 02. 94), Column 2	1, 4-9
	& EP, 563908, A1,	
	& CA, 2092971, A,	
	& US, 5432267, A	
Y	J P, 6-56692, A (雪印乳業株式会社),	9
A	1. 3月. 1994 (01. 03. 94), Column 2	1-8
	& CA, 2100720, A,	
	& EP, 588477, A2	
A	島 伸行ほか, '腫瘍細胞障害因子 (F-TCF) の構造ならびに各種生 物活性', 日本臨床, 1992, 50巻, 8号, pp.270-274	1-9



Specification

An agent for preventing and/or treating multiple organ failure

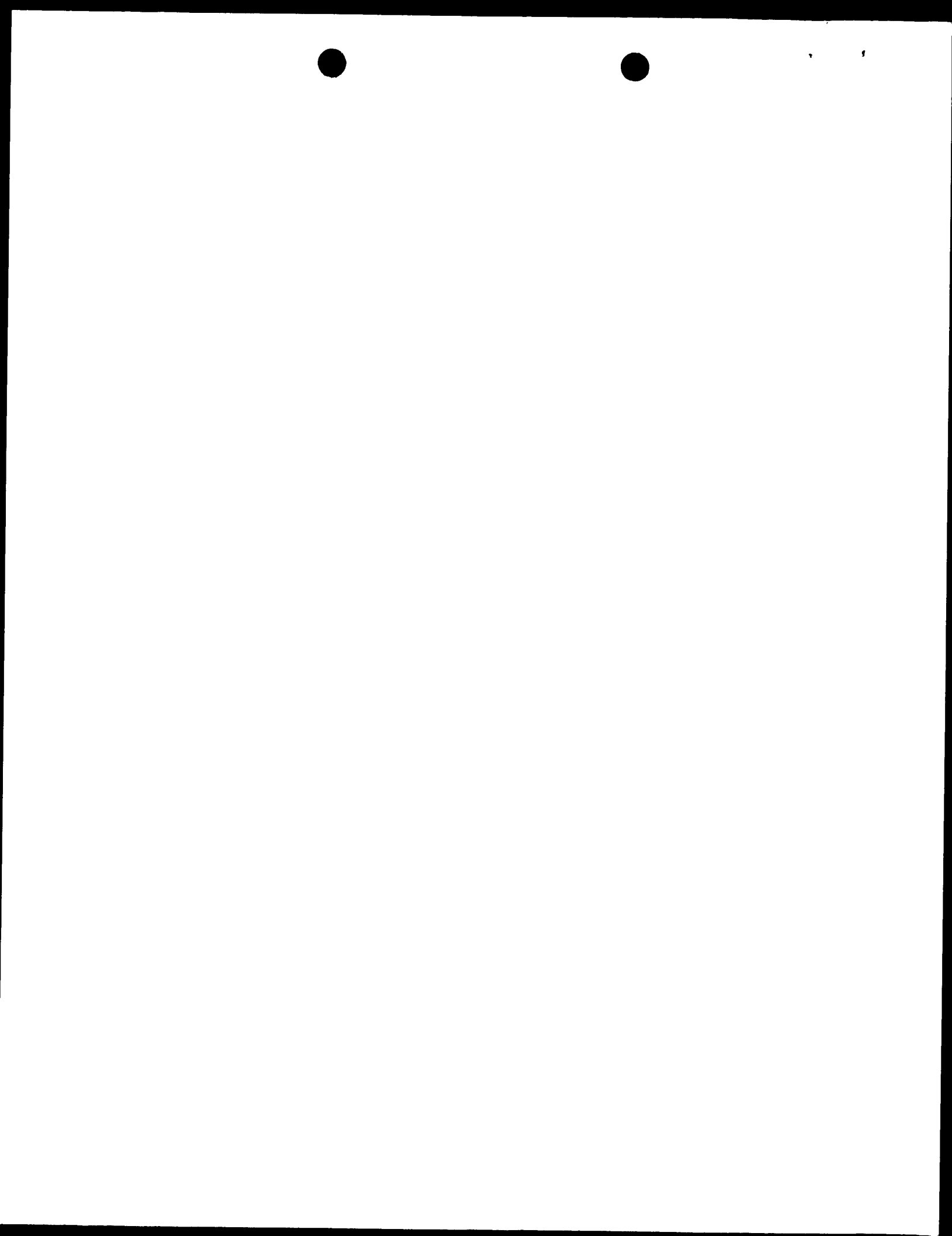
Technical field

The present invention relates to a novel agent for preventing and/or treating multiple organ failure.

Development from burn, disseminated intravascular coagulation (DIC), circulatory failure, hemorrhagic shock, infectious disease, acute pancreatitis, ischemic disorder, hepatorenal syndrome, gastrointestinal hemorrhage, nutritional metabolic failure, terminal cancer, acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), deterioration of systemic conditions due to radiation affection and cachexia etc. to multiple organ failure can be prevented or treated by the present invention.

Background technology

Onset or exacerbation of multiple organ failure can be classified into the following 3 categories with respect to mechanism: (1) Parallel induction of several organ disorders due to the same factor; (2) Induction of a specific organ dysfunction due to disorder of an organ; and (3) Participation of an iatrogenic factor. Excessive insults due to severe trauma or major surgeries, infectious diseases, shock etc. directly or through various kinds of mediator participate in the onset or deterioration of multiple organ failure by mechanism (1). In the case of multiple organ failure accompanied with organ disorder due to trauma or primary hepatic insufficiency, participation of mechanism (2) through organ correlation mechanism will largely contribute to the onset or deterioration thereof. By mechanism (3), medical care carried out during intensive care or care to correspond with an organ disorder may result in the other organ disorder. In patients, these 3 mechanisms participate to the development or deterioration of disorder in a complexed manner. The prognosis of patients of multiple organ failure is generally very poor and, in fact, the survival rate is low as 20-30% in spite of a wide variety of corresponding treatment.



Disclosure of the present invention

Considering the above situations, the present inventors eagerly investigated to look for an agent for preventing and/or treating multiple organ failure and found that multiple organ failure caused by burn, disseminated intravascular coagulation (DIC), circulatory failure, hemorrhagic shock, infectious disease, acute pancreatitis, ischemic disorder, hepatorenal syndrome, gastrointestinal hemorrhage, nutritional metabolic failure, terminal cancer, acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), deterioration of systemic conditions due to radiation affection and cachexia etc. can be prevented or treated with tumor cytotoxic factor-II (TCF-II) which is a glycoprotein derived from human fibroblast or hepatocyte growth factor (HGF) which is a proteinaceous substance derived from blood of a patient with fulminating hepatitis. Accordingly, an object of the present invention is to provide an agent for preventing and/or treating multiple organ failure comprising TCF-II or HGF as an effective ingredient.

The present invention relates to an agent for preventing and/or treating multiple organ failure comprising TCF-II or HGF as an effective ingredient.

Brief description of the drawings

Figure 1 shows the protective effect of TCF-II on endotoxin-induced multiple organ failure in example 4.

Figure 2 shows the protective effect of HGF on endotoxin-induced multiple organ failure in example 5.

Figure 3 shows the protective effect of TCF-II on dimethylnitrosamine-induced multiple organ failure in example 7.

Figure 4 shows the protective effect of TCF-II on thioacetamide intoxication-induced multiple organ failure in example 8.

Figure 5 shows the protective effect of TCF-II on acetaminophen intoxication-induced multiple organ failure in example 8.

Figure 6 shows the protective effect of TCF-II on multiple organ failure caused by mercuric chloride-induced renal insufficiency in example 9.

Figure 7 shows the protective effect of TCF-II on trypsin-induced multiple organ failure in example 10.

Figure 8 shows the protective effect of TCF-II on burn-induced multiple organ



failure in example 11.

Figure 9 shows the protective effect of TCF-II on burn-induced multiple organ failure in example 12.

Figure 10 shows the protective effect of HGF on burn-induced multiple organ failure in example 13.

In figure 1-10, ○ represents the TCF-II or HGF treatment group and ● represents the vehicle treatment group.

Best mode of embodiment for the practice of the present invention

The agent of the present invention for preventing and/or treating multiple organ failure can be useful for preventing and/or treating the development from burn, disseminated intravascular coagulation (DIC), circulatory failure, hemorrhagic shock, infectious disease, acute pancreatitis, ischemic disorder, hepatorenal syndrome, gastrointestinal hemorrhage, nutritional metabolic failure, terminal cancer, acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), deterioration of systemic conditions due to radiation affection and cachexia etc. These kinds of multiple organ failure will develop by accompanying with burn, surgical operation, administration of chemical substances (including medicine), radiation or other disorder.

TCF-II which is an effective ingredient of the present invention was found by the present inventors and a known glycoprotein derived from human fibroblast having the following characteristics:

- 1) Molecular weight(by SDS electrophoresis)
under non-reducing conditions: $78,000 \pm 2,000$ or $74,000 \pm 2,000$
under reducing conditions: $52,000 \pm 2,000$ (common b and A)
 $30,000 \pm 2,000$ (b and B)
 $26,000 \pm 2,000$ (b and C)
- 2) Isoelectric point: 7.4-8.6

The above TCF-II can be obtained by adsorbing culture medium of human fibroblast on an ion exchange column then purifying the elute by affinity chromatography (WO 90/10651) or by genetic engineering manipulation (WO



92/01053). TCF-II which is an effective ingredient of the present invention can be derived from fibroblast or produced by genetic engineering manipulation using microbial or other cell as based on the genetic sequence described in patent application WO 90/10651. Further, TCF-II obtained by genetic engineering manipulation described in WO 92/01053 can be also used. TCF-II with different carbohydrate chain or without carbohydrate chain due to difference of host cell or microbial organism can be also used. However, since carbohydrate chain correlate to metabolic rate in a biological body, one with carbohydrate chain can be preferably used. TCF-II obtained by these methods can be concentrated and purified by usual isolation and purification method. For example, precipitation with organic solvent, salting-out, gel permeation, affinity chromatography using monoclonal antibody, electrophoresis can be exemplified. Purification by affinity chromatography using monoclonal antibody can be carried out using monoclonal antibody described in a Japanese unexamined laid open patent application No.97(1993). The obtained TCF-II can be lyophilized or kept frozen.

Substance having the same activity as TCF-II can be used as the agent of the present invention. For example, hepatocyte growth factor (HGF; Japanese unexamined laid-open patent application No.22526 (1988)) which is formed by insertion of 5 amino acids into TCF-II protein or purified Scattered Factor (SF; Gherardi and Stocker, Nature, 346, 228 (1990)) can be exemplified.

HGF which is an effective ingredient has an activity proliferating hepatic cell, was isolated from the blood of a patient with fulminating hepatitis and is unknown protein with the following characteristics (Japanese patent No.2564486):

- 1) Molecular weight (SDS-PAGE); under non-reducing conditions;
76,000-92,000;
- 2) The activity described above was not deactivated by heating at 56°C for 15 minutes, but it was deactivated by heating at 80°C for 10 minutes;
- 3) Digestion with trypsin or chymotrypsin deactivated the above activity; and
- 4) It show affinity with heparin.

HGF can be obtained by heating plasma at 56 °C for about 15 minutes, taking precipitated fraction at the ammonium sulfate concentration of 1.1-1.2 M, followed by purification using gel permeation and ion exchange chromatography such as DEAE



anion exchange chromatography. Alternatively, HGF can be obtained by genetic engineering manipulation using HGF cDNA (BRRC 163, 967-973, 1989, or Japanese unexamined laid open patent application No.97(1993)).

The agent of the present invention for preventing and/or treating multiple organ failure can be administered intravenously, intramuscularly or subcutaneously. These pharmaceutical preparation can be prepared according to a known pharmaceutical preparation method and, if necessary, pH conditioner, buffer and/or stabilizer can be added thereto. Dose of the present agent can be different depending on the severness of symptom, health conditions, age, body weight of a patient. Though the dose will not be restricted, pharmaceutical preparation comprising 0.6mg-600mg-TCF-II/day, preferably 6mg-60 mg-TCF-II/day, for one adult person can be administered at once or more. The dose of HGF can be nearly the same as that of TCF-II.

Administration as described above can prevent multiple organ failure caused by various kinds of mechanism described before or alleviate symptom thereof.

Example

The present invention will be described below in detail by exemplifying examples. However, these are only examples and the present invention will not limited thereby.

[Example 1]

Purification of TCF-II

According to a method described in WO 90/10651 and a method of Higashio et al (Higashio, K. et. al, B.B.R.C., vol.170, pp397-404 (1990)), cell was cultured and purified TCF-II was obtained. That is, 3×10^6 human fibroblast IMR-90 (ATCC CCL 186) cells were placed in a roller bottle containing 100 ml DMEM medium including 5% calf fetal serum and cultured by rotating it at the rate of 0.5-2 rpm for 7 days. When the total number of cell reached 1×10^7 cells were deprived from the wall by tripsin digestion and collected at the bottom of bottle. And 100 g of ceramic with the size of 5-9 mesh (Toshiba Ceramic) was sterilized and put therein, which was cultured for 24 hours. After then, 500 ml of the above culture medium was added thereto and the culture was continued. The total volume of culture medium was recovered every 7-10 days and fresh medium was supplemented. Production was kept for 2 months like this



and 4 liters of culture medium was recovered per a roller bottle. Specific activity of TCF-II in culture medium obtained as above was $32 \mu\text{g/ml}$. Culture medium (750 L) was concentrated by ultrafiltration using membrane filter (MW 6,000 cut; Amicon) and purified by 5-steps chromatography, that is, CM-Sephadex C-50 (Pharmacia), Con-A Sepharose (Pharmacia), Mono S column (Pharmacia), Heparin-Sepharose (Pharmacia) to yield purified TCF-II. This TCF-II had the same molecular weight and isoelectric point as described before.

[Example 2]

Production of recombinant TCF-II

According to the method described in WO 92/01053, cell transformed with TCF-II gene was cultured and purified TCF-II was obtained. That is, transformed Namalwa cell was cultured and 20 l of culture medium was obtained. This culture medium was treated by CM-Sephadex C-50 chromatography, Con-A Sepharose CL-6B chromatography and finally HPLC equipped with a Mono S column to yield about 11 mg of recombinant TCF-II. This TCF-II had also the same molecular weight and isoelectric point as described before.

[Example 3]

Production of recombinant HGF

Expression vector of HGFcDNA was constructed by inserting 2.4 kb fragment of transcription unit of mouse dihydrofolate reductase (DHFR) into NheI site of plasmid pcDNA1 and, further, inserting 2.3 kb of HGFcDNA cloned by Miyazawa (BBRC 163, 967-973, 1989) into the downstream of Cytomegalovirus (CMV) promoter. The constructed HGFcDNA expression vector (μg and pSV2 neo 1 μg were cotransfected into Namalwa cell by liposome intervened transfection method using lipofectin. After transformed cells were screened by G418 resistency, gene amplification was carried out using methotrexate (MTX). HGF highly producing cell line was cultured in 2 L roller bottle containing 1 L DMEM medium including 5% bovine serum for 7 days. Culture was carried out using 20 roller bottles (2 rpm) and 21 L of culture medium was obtained. The culture medium obtained like this contained 4 mg/L HGF. According to a modified method of Higashio (Higashio et. al., vol. 170, 397-404, 1990),



20 L of culture medium containing HGF was purified by 3 steps chromatography, that is, CM-Sephadex C-50 (Pharmacia), MonoS column (Pharmacia) and Heparin 5-PW (Toso) and purified HGF with homogeneous mobility of SDS-electrophoresis was obtained in about 60 % yield.

[Example 4]

Protective effect on endotoxin-induced multiple organ failure

TCF-II (100 μ g/mouse) obtained in example 2 was administered intravenously to 7 weeks old male ICR mice (25 mice/1 group) twice daily for 5 days (only at the final day, once a day). The control group was treated with the vehicle (citric acid buffer solution with pH 6.03, hereinafter the same solution was used as control group). At 6 hours after the final administration, lethal dose of endotoxin (LPS-E-coli; 20mg/kg, Difco laboratories) was administered intravenously. The survival rates thereof was shown in figure 1. The survival rates on day 4 or later were 12% (3/25 mice) in the vehicle group, and those in the TCF-II group were 56% (14/25 mice).

From the results, TCF-II was confirmed to show an excellent protective effect on endotoxin-induced multiple organ failure.

[Example 5]

Protective effect on endotoxin-induced multiple organ failure

HGF (100 μ g/mouse) obtained in example 3 was administered intravenously to 7 weeks old male ICR mice (15 mice/1 group) twice daily for 5 days (only at the final day, once a day). The control group was treated with the vehicle (citric acid buffer solution with pH 6.03). At 6 hours after the final administration, lethal dose of endotoxin (LPS-E-coli; 20mg/kg, Difco laboratories) was administered intravenously. The survival rates thereof was shown in figure 2. The survival rates on day 4 or later were 13% (2/15 mice) in the vehicle group, and those in the 1mg/kg of HGF treated group was 33% (5/15 mice). From the results, HGF was confirmed to show an excellent protective effect on endotoxin-induced multiple organ failure.

[Example 6]

Protective effect on endotoxin-induced multiple organ failure



Animal model of multiple organ failure was made by continuously injecting endotoxin (LPS-E-coli; 10mg.kg/day, Difco laboratories) to 6 weeks old male Wister rats using osmotic pump (Model 7 I2001, Alzet). After then, animals were divided into groups (9 rats/ 1 group) and vehicle or TCF-II (1 mg/kg) was administered intravenously once a day for 7 days. The results of clinical examination at the day after the final administration were shown in table 1. In the vehicle group, the serum levels of total protein, albumin, total cholesterol and the plasma levels of plasminogen were decreased at the day after the final administration, indicating that these rats were cachexia, but those in TCF-II treated group were significantly improved (Table 1). From the results, TCF-II was confirmed to show an excellent protective effect on multiple organ failure caused by endotoxin-induced cachexia.

Table 1

Assay	Normal	LPS-induced model	
		vehicle	TCF
Total protein(g/dl)	5.4 ± 0.1	4.5 ± 0.1	5.5 ± 0.1**
Albumin(g/dl)	2.5 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.4 ± 0.0**
Plasminogen(%)	105.5 ± 7.1	74.4 ± 3.6	96.6 ± 2.7**
Total cholesterol(mg/dl)	73.2 ± 2.3	59.0 ± 3.6	88.6 ± 2.9**

(** : significant difference(p<0.01) from vehicle administered group)

[example 7]

Protective effect on dimethylnitrosamine-induced multiple organ failure

TCF-II (100 μ g/mouse) was administered intravenously to 7 weeks old male ICR mice (25 mice/1 group) twice daily for 5 days (only at the final day, once a day). The control group was treated with the vehicle. At 6 hours after the final administration, lethal dose of 0.15% dimethylnitrosoamine (DMN) (vehicle:physiological saline solution, 0.1 ml/10 g body weight, Tokyo-kasei-kogyo) was administered intravenously. The



results of clinical examination of mice at 24 hours after the onset was shown in table 2 and the survival rates thereof was shown in figure 3. In the vehicle group, the plasma levels of GOT and GPT at 24hr after DMN administration were remarkably increased and the plasma clotting time was prolonged, but those of TCF-II treated group were significantly suppressed (Table 2). Further, in the vehicle group, all the mice died after 4 days, all the mice in the TCF-II group survived (Figure 3). From the results, TCF-II was confirmed to show an excellent protective effect on dimethylnitrosamine-induced multiple organ failure.

Table 2

Assay	Normal	DMN-induced model	
		vehicle	TCF-II
GOT(U/L)	42±2	810±252	51±8**
GPT(U/L)	28±3	1580±506	97±21**
Plasma clotting time(sec)	17±0.0	22±2.2	17±0.1**

(** : significant difference ($p<0.01$) from vehicle group)

[Example 8]

Protective effect on drug intoxication-induced multiple organ failure

TCF-II (100 μ g/mouse) was administered intravenously to 7 weeks old male ICR mice (25 mice/1 group) twice daily for 5 days (only at the final day, once a day). The control group was treated with the vehicle. At 6 hours after the final administration, lethal dose of thioacetamide (600 mg/kg, Wako-junyaku) or acetaminophen (800 mg/kg, Sigma) was administered. The survival rates thereof was shown in figure 4 and figure 5. In thioacetamide examination, survival rates after day 4 or later of vehicle administered group was 12% (3/25 mice), that of TCF-II administered group was 93% (23/25 mice). In acetaminophen experiment, though 68% (17/25 mice) of vehicle administered group died at the day after acetaminophen treatment, the whole mice of TCF-II administered group survived. From the results,



TCF-II was confirmed to show an excellent protective effect on drug intoxication-induced multiple organ failure.

[Example 9]

Protective effect on multiple organ failure caused by mercuric chloride-induced renal insufficiency.

TCF-II (100 μ g/mouse) was administered intravenously to 7 weeks old male ICR mice (25 mice/1 group) twice daily for 5 days (only at the final day, once a day). The control group was treated with the vehicle. At 6 hours after the final administration, lethal dose of mercuric chloride (Wako-junyaku) was administered intravenously. The survival rates thereof was shown in figure 6. Though the survival rates after 4 days of vehicle administered group was 8% (2/25 mice), the whole mice of TCF-II administered group survived.

From the results, TCF-II was confirmed to show an excellent protective effect on multiple organ failure caused by mercuric chloride-induced.

[Example 10]

Protective effect on tripsin-induced multiple organ failure

Vehicle (55 rats/1 group) or 1 mg/kg TCF-II (35 rats/1 group) was administered intravenously to 8 weeks old male Wister rats twice daily for 5 days (10 times). At the day after the final administration, 0.16 ml of mixed solution of lethal dose of tripsin (Sigma; 50000 U/ml) and taurocolic acid (Sanko-junyaku; 100 mg/ml) was injected into pancreas through the common bile duct. The survival rates thereof was shown in figure 7. Though the survival rates after 6 days of vehicle administered group was 5% (3/55 rats), that of TCF-II administered group was 29% (10/35 rats) (figure 7). From the results, TCF-II was confirmed to show an excellent protective effect on tripsin-induced multiple organ failure.

[Example 11]

Protective effect on burn-induced multiple organ failure

Vehicle or 1 mg/kg TCF-II was administered intravenously to 7 weeks old male Wister rats (50 rats/ 1 group) twice daily for 6 days (only once a day on the final day).



At 6 hours after the final administration, 25% burn (250 °C, 30 sec.) was made on shaved back with a heating plate (Iwaki-glass). The survival rates thereof was shown in figure 8. And the results of clinical examination at 4 hours after burn treatment was shown in table 3. Decrease of circulating volume of Plasma (increase in Ht value, decrease in total protein, decrease in albumin) and hepatic derangement were observed and onset of multiple organ failure caused by burn shock was confirmed (Table 3). In addition, though the survival rates after 6 days of vehicle administered group was 12% (6/50 rats), that of TCF-II administered group was 40% (20/55 rats) (Figure 8). From the results, TCF-II was confirmed to show an excellent protective effect on burn-induced multiple organ failure.

Table 3

	Before burn treatment	4 hours after burn treatment
Hematocrit value (%)	44.8±1.8	53.9±3.6
Total protein (g/dl)	7.2±0.5	5.8±0.7
Albumin (g/dl)	3.1±0.2	2.4±0.3
GPT (U/L)	20.5±5.8	150.0±30.4
Urea nitrogen (mg/dl)	21.5±1.9	43.5±7.3

[Example 12]

Protective effect on burn-induced multiple organ failure

In 9 weeks old male Wister rats, 40% burn was made using 85°C hot water. After burn, rats were divided into 2 groups consisting of 27 rats each. Vehicle or 1 mg/kg TCF-II was administered intravenously 3 times/daily for 3 days (9 times). The survival rates thereof was shown in figure 9. Though the survival rates after 8 days of vehicle administered group was 37% (10/27 rats), that of TCF-II administered group was 67% (18/27 rats). From the results, TCF-II was confirmed to show an excellent protective effect on burn-induced multiple organ failure.



[Example 13]

Protective effect on burn-induced multiple organ failure

In 9 weeks old male Wister rats, 40% burn was made using 85 °C hot water. After burn, rats were divided into 2 groups consisting of 10 rats each. Vehicle or 1 mg/kg HGF was administered intravenously 3 times/daily for 3 days (9 times). The survival rates thereof was shown in figure 10. Though the survival rates after 11 days of vehicle administered group was 20% (2/10 rats), that of HGF administered group was 40% (4/10 rats). From the results, HGF was confirmed to show an excellent protective effect on burn-induced multiple organ failure.

[Example 14]

Manufacturing of pharmaceutical preparation of TCF-II

An example of manufacturing injections of recombinant TCF-II obtained example 2 was shown.

- | | |
|---------------------|------------|
| (1) TCF-II | 20 μ g |
| human serum albumin | 100 mg |

The above composition was dissolved in citric acid buffer solution with pH 6.03 (consisting of 10 mM sodium citrate, 0.3 M sodium chloride, 0.03% polysorbate) so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

- | | |
|---------------------|------------|
| (2) TCF-II | 40 μ g |
| Tween 80 | 1 mg |
| human serum albumin | 100 mg |

The above composition was dissolved in physiological saline solution for injections so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

- | | |
|------------|------------|
| (3) TCF-II | 20 μ g |
| Tween 80 | 2 mg |
| Sorbitol | 4 g |

The above composition was dissolved in citric acid buffer solution with pH 6.03 so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.



(4) TCF-II	40 μ g
Tween 80	1 mg
Glycine	2 g

The above composition was dissolved in physiological saline solution for injections so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization. 7

(5) TCF-II	40 μ g
Tween 80	1 mg
Sorbitol	2 g
Glycine	1 g

The above composition was dissolved in physiological saline solution for injections so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

(6) TCF-II	20 μ g
Sorbitol	4 g
human serum albumin	50 mg

The above composition was dissolved in citric acid buffer solution with pH 6.03 so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

(7) TCF-II	40 μ g
Glycine	2 g
human serum albumin	50 mg

The above composition was dissolved in physiological saline solution for injections so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

(8) TCF-II	40 μ g
human serum albumin	50 mg

The above composition was dissolved in citric acid buffer solution with pH 6.03 so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

[Example 15]



Manufacturing of pharmaceutical preparation of HGF

An example of manufacturing injections of recombinant HGF obtained in example 3 was shown.

- | | |
|---------------------|------------|
| (1) HGF | 40 μ g |
| human serum albumin | 100 mg |

The above composition was dissolved in citric acid buffer solution with pH 6.03 so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

- | | |
|---------------------|------------|
| (2) HGF | 20 μ g |
| Tween 80 | 1 mg |
| human serum albumin | 100 mg |

The above composition was dissolved in physiological saline solution for injections so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

- | | |
|---------------------|------------|
| (3) HGF | 30 μ g |
| Sorbitol | 4 g |
| human serum albumin | 50 mg |

The above composition was dissolved in 0.01 M phosphate buffer solution with pH 7.0 so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

Industrial applicability

An agent for preventing and/or treating multiple organ failure comprising TCF-II or HGF as an effective ingredient will be provided by the present invention.

The agent for preventing and/or treating multiple organ failure of the present invention will be useful for preventing and/or treating the development from burn, disseminated intravascular coagulation (DIC), circulatory failure, hemorrhagic shock, infectious disease, acute pancreatitis, ischemic disorder, hepatorenal syndrome, gastrointestinal hemorrhage, nutritional metabolic failure, terminal cancer, acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), deterioration of systemic conditions due to radiation affection and cachexia etc. to multiple organ failure.



Claims

1. An agent for preventing and/or treating multiple organ failure comprising Tumor cytotoxic factor-II (TCF-II) or Hepatocyte growth factor (HGF) as an effective ingredient.
2. The agent according to claim 1 wherein said multiple organ failure is one induced by administration of chemical substances.
3. The agent according to claim 2 wherein said chemical substance is endotoxin.
4. The agent according to claim 2 wherein said chemical substance is dimethylnitrosamine.
5. The agent according to claim 2 wherein said chemical substance is trypsin.
6. The agent according to claim 1 wherein said multiple organ failure is one with a primary cause of drug intoxication.
7. The agent according to claim 6 wherein said drug is thioacetamide or acetaminophen.
8. The agent according to claim 1 wherein said multiple organ failure is one with a primary cause of renal insufficiency induced by mercuric chloride.
9. The agent according to claim 1 wherein said multiple organ failure is one induced by burn.



Abstract

The present invention is to provide an agent for preventing and/or treating multiple organ failure comprising Tumor cytotoxic factor-II (TCF-II) or Hepatocyte growth factor (HGF) as an effective ingredient.

The agent of the present invention will be useful for preventing and/or treating the development from burn, disseminated intravascular coagulation (DIC), circulatory failure, hemorrhagic shock, infectious disease, acute pancreatitis, ischemic disorder, hepatorenal syndrome, gastrointestinal hemorrhage, nutritional metabolic failure, terminal cancer, acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), deterioration of systemic conditions due to radiation affection and cachexia etc. to multiple organ failure.

